

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-257831
(43)Date of publication of application : 18.10.1990

(51)Int.Cl. A23J 3/34
A23J 3/16
A23L 1/20

(21)Application number : 01-261630 (71)Applicant : AJINOMOTO CO INC
(22)Date of filing : 06.10.1989 (72)Inventor : SOEDA TAKAHIKO
NONAKA MASAHIKO
KOBATA HIROKO
ABE HIROKO
TSUCHIYA TOSHIHIRO

(30)Priority
Priority number : 36331056 Priority date : 08.12.1988 Priority country : JP

(54) VEGETABLE PROTEIN POWDER AND PRODUCTION OF BEAN CURD USING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce smooth bean cured having great holding power by reacting a vegetable protein-containing aqueous solution with a transglutaminase, providing vegetable protein powder improved in gelation ability, color tone, taste and flavor and using the resultant powder as a raw material.

CONSTITUTION: A reducing agent, such as ascorbic acid, as desired, is added to an aqueous solution containing a vegetable protein, such as soybean protein or wheat protein, and, as desired, further heated to regulate the pH to 5.5-8.0, preferably 5.5-7.0. A transglutaminase in an amount of 0.1-100U, preferably 0.2-50U based on 1g protein is then added to the resultant aqueous solution and preferably reacted therewith at 0-70° C, preferably 20-60° C, heated and dried to afford vegetable protein powder. The obtained soybean protein powder is then used as a raw material, heated at 30-85° C and subsequently coagulated to provide bean curd.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
لِمَنْ يَعْلَمُ

⑨日本国特許庁 (JP) ⑩特許出願公開
 ⑪公開特許公報 (A) 平2-257831

⑫Int. Cl.

A 23 J 3/34
 3/16
 A 23 L 1/20

識別記号 厅内整理番号
 502 6712-4B
 104 6712-4B
 Z 7823-4B

⑬公開 平成2年(1990)10月18日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全13頁)

⑭発明の名称 植物性タンパク粉末およびそれを用いる豆腐の製造法

⑮特 願 平1-261630

⑯出 願 平1(1989)10月6日

優先権主張 ⑭昭63(1988)12月8日 ⑮日本(JP) ⑯特願 昭63-310566

⑰発明者 添田 孝彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

⑰発明者 野中 雅彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

⑰発明者 木幡 浩子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

⑰発明者 阿部 宏子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

⑰出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
 最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

植物性タンパク粉末およびそれを用いる豆腐の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) pHが5.5-8.0である植物性タンパク含有水溶液にタンパク1g当たりトランスグルタミナーゼを0.1-100U添加し、温度0-70℃で作用させた後加熱し、次いで乾燥してなる植物性タンパク粉末。

(2) 植物性タンパク含有水溶液が加熱されたものである請求項(1)記載の植物性タンパク粉末。

(3) 植物性タンパク含有水溶液が大豆タンパク含有水溶液で、かつ植物性タンパク粉末が分離大豆タンパク粉末である請求項(1)または(2)記載の植物性タンパク粉末。

(4) 植物性タンパク含有水溶液が大豆タンパク含有水溶液で、かつ植物性タンパク粉末が豆乳粉末である請求項(1)または(2)記載の植物性タンパク粉末。

(5) 植物性タンパク含有水溶液に還元剤を添加することを特徴とする請求項(1)乃至(4)記載の植物性タンパク粉末。

(6) 請求項(1)乃至(5)記載の植物性タンパク粉末のうち、大豆タンパク粉末を原料として、かつ30-85℃で加熱後、凝固することを特徴とする豆腐の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はトランスグルタミナーゼ(以下 TGaseと略記する。)を利用して改質された植物性タンパク粉末、およびその植物性タンパク粉末のうち、大豆タンパク粉末を原料として用いる豆腐の製造法に関するものである。

(従来技術とその課題)

従来より、かまぼこ、ちくわ、揚げかま、ソーセージ、ハムなどの魚肉・畜肉製品は原料価格の変動が激しく、コストを安定させるために大豆タンパクに代表される植物性タンパクを使用することが行われている。しかしながら、大豆タンパク

特開平2-257831 (2)

に代表される植物性タンパクは、その物性・臭い・色調の点で動物性タンパクとなじみにくく、未だ充分に満足できる品質特性のものは得られていない。

この様な理由から、従来得られている植物性タンパクの前記の様な製品への利用は、固形分換算で通常、製品全体の1-1.5%多くても3%程度の使用にとどまっている。

一方、古来より伝統的な食品として豆腐があるが、この製造法としては九大豆より豆乳を得、これに凝固剤を加える方法で作られている。従来よりこの豆乳を得るまでに半日、季節によっては1日以上を要し、豆腐製造の律速段階となっていた。また、近年これを解決すべく、粉末豆乳（豆腐粉ともいうが、ここでは豆乳粉末という用語を用いる。）の開発が試みられ、いくつかの商品も見受けられる。しかしながら、これらはいずれも従来法で作られた豆乳の濃度調節に用いられる場合が多い。また、これらは乾燥および粉末化の過程で受けける変性が大きく、これ单独から得られた豆乳

で豆腐を作る場合、いわゆる充填豆腐は可能なものの、保水力が小さく、凝固状態が非常に悪いため、木綿ごし豆腐などは作ることができなかった。さらに豆腐の製造工程では凝固前に必ず豆乳を沸騰させる必要があった。

そこで、本発明の目的は物性・臭い・色調の改善された植物性タンパクを提供し、また大豆タンパクにおいては、保水力の高く、しかもなめらかであるという特徴をもつ各種豆腐（木綿ごし・紺ごし・充填）を容易に製造することができる豆乳粉末を提供することである。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、植物性タンパク含有水溶液に、TGaseを作用させることによりゲル化能が改善され、また色調・味・風味も改善された植物性タンパク粉末をしかも高収率で得ることができ、また同様な方法により大豆タンパク水溶液から、保水力の高く、なめらかであるという特徴をもつ各種豆腐（木綿ごし・紺ごし・充填）を沸騰過程を経

ずに製造することのできる豆乳粉末が得られることを見いだし、この知見に基いて本発明を完成するに至った。

本発明において用いられる植物性タンパクとしては、大豆タンパク、小麦タンパク、トウモロコシタンパク、米タンパクを例示することが出来る。この様な植物性タンパクを含有する水溶液としては、植物性タンパクが例えば大豆タンパクの場合は、濃縮タンパク、分離タンパクなどを製造する工程中に生ずるタンパク含有水溶液をそのまま使用するとか、類似の方法で調整したものを使用するとい。もちろん九大豆の加水磨碎物や豆乳なども使用に適している。他の植物性タンパクの場合も当業者であればそれを含有する水溶液を調整することは容易である。

通常、分離大豆タンパクは、例えば次の様にして製造される。1-(1)脱脂大豆を温度40-70℃、pH6-8において7-15重量部の水で水抽出する。pHの調整が必要ならばH₂SO₄、HCl、H₃PO₄などの食品級酸、またはNaOHなどの食品級

アルカリを使用するとよい。抽出処理物からデカンター、遠心分離機などによりオカラを分離して抽出液を得る。1-(2)この抽出液をH₂SO₄、HCl、H₃PO₄などの酸を使用するタンパクの等電沈殿処理に付する(pH4.5付近)。処理後デカンター、遠心分離機などによりホエイを分離してタンパクカードを得る(固形分30-35%)。1-(3)5-10重量部の水を加えてこのカードをディスプローザー、ミキサー、攪拌機などにより解碎してタンパクスラリーを調整し(タンパク含量2-5%)、ついで得られたスラリーは所望によりNaOHなどにより中和して中和スラリーとする(通常はpH7)。1-(4)タンパクの腐敗を防止するために殺菌し、併せてこれにゲル化性、乳化性、泡立ち性などの機能性を付与して品質特性を改善するために中和し、またはしないタンパクスラリーをエジェクタータイプの加熱機などにより加熱し(70-200℃)、次いで噴霧などにより乾燥して(ドライヤー入口温度130-200℃)、目的たる分離大豆タンパクが得られる。

特開平2-257831 (3)

また、豆乳粉末は例えば次の様にして得られる。2-(1)丸大豆1重量部を室温で12時間水に浸漬し、次いで水を9重量部となる様加え、ミキサーなどで磨碎する。2-(2)この磨碎液を100℃まで加熱し2-3分沸騰状態を保つ。2-(3)次いでデカンター、遠心分離機などによりオカラを分離して豆乳が得られる。2-(4)工程1-(4)と同様の目的方法で加熱し、乾燥して目的の豆乳粉末が得られる。

本発明の植物性タンパク粉末は、上記工程1-(3)のタンパクスラリー（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）、上記工程1-(1)の抽出液（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）上記工程2-(1)の加水磨碎物（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）および上記工程2-(3)の豆乳（これは本発明に謂う植物性タンパク含有水溶液に包含される。）を使用して得ることができる。つまり本発明で用いられる植物性タンパク含有水溶液は、未加熱であっても加熱され

たものであってもよい。

植物性タンパク含有水溶液に対して TGase を作用させるということは、より詳しくは TGase のタンパク架橋能を活用し、タンパクを TGase により架橋化することであるが、その作用条件は次の通りである。

本発明で使用する TGase の起源は特に問わず、例えばモルモットの肝臓から分離したもの（以下、 MTGase と略記する。）、微生物が産生するもの（以下、 BTGase と略記する。）、更には天然物、例えば野菜、果実などの水抽出液等、魚類など水産物の抽出液および洗浄液等に含有されるものを挙げることができる。 MTGase は、たとえば特開昭58-14964号に記載の方法で調整することができる。 BTGase は、新規酵素であって、特開平1-27471に係わるもので、その酵素特性、製造法等について別項に記載する。

TGase の使用量は、タンパク 1 g 当り 0.1-100 U、好ましくは 0.2-50 U である。使用量が少なすぎると得られる植物性タンパク粉末に

ゲル化促進効果はみられず、 TGase 非使用の場合（対照）に対して差がみられず、一方多すぎるとやはりゲル化促進効果がみられず、形成したゲルはもろくなり、かつ色調・臭いの点でも改善効果がみられず、不適である。

pHに関しては、5.5-8.0、好ましくは5.5-7.0、さらに好ましくは、5.7-6.5の範囲である。pHが低すぎるとゲル化促進効果がせず、TGase 非使用の場合（対照）と差がなく、高すぎるとゲル化促進効果は大となるものの、色調・臭いの改善がみられない。

温度は0-70℃、好ましくは20-60℃の範囲である。低すぎると最長時間の処理時間が必要であり、高すぎると架橋反応が速すぎて反応のコントロールが困難である。

植物性タンパク含有水溶液におけるタンパク含量（濃度）は特に問題とならないが、通常4-15重量%の範囲が採用される。もちろん上記範囲に限定されるわけではない。

この様な作用条件で処理すると1分乃至3時間

で適度な架橋化が起こる。

前記の様な通常の分離大豆タンパク製造工程の工程1-(3)の中和タンパクスラリーまたは工程1-(1)の抽出液を植物性タンパク含有液として採用して本発明方法を実施する場合、該前記通常の分離大豆タンパク製造工程の工程1-(3)または工程1-(1)において前述の条件で TGase を作用させて変更を加える以外は全く通常の分離大豆タンパクを調整するのと同じ方法により改良された分離大豆タンパクが得られる。因みに、 TGase は中和タンパクスラリー、抽出液のいずれに作用させてもよいが、作用後のタンパクの分離操作性や最終製品の収率などの点から、中和タンパクスラリーに TGase を作用させて本発明の植物性タンパク粉末を得るのが好ましい。特に上記の様な従来の分離大豆タンパク製造工程における工程1-(3)で本法を実施すると、実施しない場合に比較して最終分離大豆タンパクの収率の向上が顕著である。

また、豆乳の製造工程においては、工程2-(1)の加水磨碎物および工程2-(3)の豆乳、いずれに

特開平2-257831 (4)

TGaseを作用させてもかまわない。しかしながら、得られた豆乳粉末を豆腐製造の目的に使用する場合には、工程2-(3)の豆乳にTGaseを作用させた方がより好ましいものとなる。

さらに、植物性タンパク含有水溶液に還元剤を添加すると、豆腐製造の際保水力が高くなる。このときの還元剤は前記工程中の工程1-(4)および工程2-(4)以前であればいずれの段階で添加してもよい。また添加量としては使用する還元剤によっても異なり、一概に決めることはできないが、5%以下の使用で充分である。還元剤としては、アスコルビン酸等食品に添加の認められているものであれば、いずれも使用することができ、残存濃度の定められているものであれば、それに従って使用すればよい。

植物性タンパク含有水溶液にTGaseを作用させた後に加熱するが、これはタンパクの腐敗防止のための殺菌と併せて、目的の植物タンパクの機能性を付与するためである。この目的からは、加熱温度は70-200℃がよく、色調・ゲル化性・

および2-(4)における加熱、乾燥の条件をほとんどそのまま本発明に適用することができる。

以上、本発明を分離大豆タンパクおよび豆乳粉末に適用させて説明したが、もちろん本発明はこれに限られるものでないということは当業者であれば容易に理解できよう。つまり、高純度小麦タンパク、高純度米タンパクなども本法により機能性を付与したものが得られる。更にまた、従来法で一旦製造して得た分離大豆タンパク、濃縮大豆タンパクなどを本法の植物タンパクとして採用し、これに本法を実施すれば、そのような分離大豆タンパク、濃縮大豆タンパクなどに所望の特性を付与することもでき本発明品を記中に入る。

また、本発明の豆乳粉末で豆腐を製造する際には、凝固剤を特に選ぶことなく、現在行われているあらゆる方法での豆腐製造はもちろん可能であるが、本発明の特徴として、凝固温度（通常70-80℃）まで、即ち30-85℃で加熱すればよいところにある。つまり、凝固前に豆乳液を沸騰させる必要がなくとも、保水力が高くしかも非

良いの面から好ましくは100-150℃である。加熱温度が70℃以下ではタンパクの改質とTGaseの失活が不十分であり、200℃以上では良いが強くなつて不適である。加熱は直接もしくは間接加熱を用い、例えば牛乳の殺菌などに用いられるプレート式瞬間短時間加熱機を使用して行うことができる。もちろん上記以外の方法を用いてもかまわない。

次いで行う乾燥は、その条件は特に制限されるものではないが、所望の機能性を付与されたタンパクが更に変性を受けるような温度などの条件を避けるべきことはもちろんで、通常ドライヤーの入口温度130-200℃の温度でノズルタイプやディスクタイプのスプレードライヤーなどを用いて行うことができる。もちろん凍結真空乾燥も差し支えない。

前記の様な通常の分離大豆タンパクおよび豆乳粉末製造工程内で生ずる中和タンパクスラリー、抽出液を原料として、本発明にかかる植物性タンパク粉末を得る場合には、通常の製造工程1-(4)

常になめらかな豆腐が得られる点にある。もちろん本発明で得られた豆乳粉末を原料にして、通常通り凝固前に豆乳液を100℃まで沸騰させてもよい。この場合も原料として本発明に係わる豆乳粉末を用いているので、非常に高品質の豆腐を得ることができる。

特開平1-27471号公報にも開示されているが、一応念の為に新規トランスグルタミナーゼBTGaseを説明しておく。

(新規トランスグルタミナーゼBTGase)

(1) トランスグルタミナーゼとその由来

トランスグルタミナーゼ(TGase)は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基のε-カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。このTGaseは、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基のε-アミノ基が作用すると、分子内及び分子間にε-(τ -Glu)-Lys架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

特開平2-257831 (5)

TGaseのこのような性質により、TGaseを用いてタンパク含有溶液又はスラリーをゲル化させることができる。

TGaseは、これまでモルモット肝由来のもの(MTGase)などの動物由来のものが知られているが、動物由来のものは、安価にまた大量に入手するのが困難であり、タンパク質をゲル化するときは酵素濃度および基質濃度を共に高くする必要があり、またCa²⁺依存性であるので用途が制限される。

本発明で使用できる新規トランスクルタミナーゼ(BTGase)は、微生物、例えば、ストレプトベルチシリウム属の菌により産生されるものであるが、微生物由来のTGaseについての報告は現時点ではない。

本発明で使用できる微生物由来のBTGaseは安価に供給され、かつ精製も容易であるので実用性が大である。また、BTGaseを用いることにより、カルシウム非存在下又カルシウム存在下のいずれでも酵素(BTGase)濃度及び基質濃度が非常に低い

ところで品質の優れたゲル化物を製造できるという利点がある。

(2) BTGaseの製造

BTGaseを産生する微生物は、例えば、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム(*Streptoverticillium griseocarneum*)IFO 12776、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム(*Streptoverticillium cinnamoneum* sub sp *cinnamoneum*)IFO 12852、ストレプトベルチシリウム・モバラエンス(*Streptoverticillium moharaense*)IFO 13819等が挙げられる。

これら微生物を培養し、トランスクルタミナーゼを取得するための培養法及び精製法等は次の通りである。

培養形態としては、液体培養、固体培養いずれも可能であるが、工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。又、使用する培養源としては、一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩及びその他の微量栄養源の他、ストレ

プトベルチシリウム属に属する微生物の利用出来る栄養源であれば全て使用出来る。培地の炭素源としては、ブドウ糖、ショ糖、ラスター・ゲン、グリセリン、デキストリン、澱粉等の他、脂肪酸、油脂、有機酸などが単独又は組合せて用いられる。窒素源としては、無機窒素源、有機窒素源のいずれも使用可能であり、無機窒素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、塩化アンモニウム等が挙げられる。又、有機窒素源としては大豆、米、トウモロコシ、小麦などの粉、糖、脱脂粉をはじめコーンスティーブリカーパー、ペプトン、肉エキス、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス等が挙げられる。無機塩及び微量栄養素としては、リン酸、マグネシウム、カリウム、鉄、カルシウム、亜鉛等の塩類の他ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等の菌の生育やBTGaseの産生を促進するものであれば必要に応じて使用出来る。

培養は好気的条件で、培養温度は菌が発育しBTGaseが産生する範囲であれば良く、好ましくは

25~35℃である。培養時間は、条件により異なるが、BTGaseが最も産生される時間まで培養すれば良く、通常2~4日程度である。

BTGaseは液体培養では培養液中に溶解されており、培養終了後培養液より固体分を除いた培養ろ液より採取される。

培養ろ液よりBTGaseを精製するには、通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。

例えば、エタノール、アセトン、イソプロピルアルコール等の有機溶媒による処理、硫安、食塩等により塩析、透析、限外ろ過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、吸着剤、等電点分画等の方法が使用出来る。又、これらの方法を適当に組合せる事によりBTGaseの精製度が上る場合は適宜組合せて行う事が出来る。これらの方法によって得られる酵素は、安定化剤として各種の塩類、糖類、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え或いは加えることなく、限外ろ過濃縮、逆浸透濃縮、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥の方法により液状又は固体のBTGaseを得る

特開平2-257831 (6)

ことが出来る。

BTGaseの活性測定はベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを基質としてCa²⁺非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯を形成させ525nmの吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め活性を算出する。

BTGase活性は、特に記載しないかぎり以下に記載する方法により測定した。

<活性測定法>

試薬A 0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH6.0)

0.1Mヒドロキシルアミン

0.01M還元型グルタチオン

試薬B 3N-塩酸

12%トリクロロ酢酸

5%Fe²⁺ + H₂O (0.1N-H₂Oに溶解)

上記溶液の1:1:1の混合液を試薬Bとする。

的性質は次の通り。

a) 至適pH:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、37°C、10分反応で、BTG-1の至適pHは6~7であり、BTG-2の至適pHは6~7付近にあり、BTG-3の至適pHは6~7付近にある。

b) 至適温度:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、pH6、10分反応で、BTG-1の至適温度は55°C付近であり、BTG-2の至適温度は45°C付近であり、BTG-3の至適温度は45°C付近にある。

c) pH安定性:

37°C、10分間処理で、BTG-1はpH5~9で安定であり、BTG-2はpH5~9であり、BTG-3はpH6~9で安定である。

d) 温度安定性:

pH7で10分間処理では、BTG-1は40°Cでは

酵素液の0.05mlに試薬A 0.5mlを加えて混合し37°Cで10分間反応後、試薬Bを加えて反応停止とFe錯体の形成を行った後525nmの吸光度を測定する。対照としてあらかじめ熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵素液のかわりにL-グルタミン酸モノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1μモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

(3) BTGaseの酵素特性

上のようにして得られる精製BTGase、即ちストレブトベチシリウム・モバラヌスIFO 13819のトランスクルタミナーゼ(BTG-1と命名)、ストレブトベルチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776のトランスクルタミナーゼ(BTG-2と命名)、ストレブトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウムIFO 12852のトランスクルタミナーゼ(BTG-3と命名)についての酵素化学

88%活性が残存し、50°Cでは74%活性が残存し、BTG-2は40°Cでは86%活性が残存し、50°Cでは56%活性が残存し、BTG-3は40°Cで80%活性が残存し、50°Cでは53%活性が残存する。

e) 基質特異性:

各BTGaseを用い、各種合成基質とヒドロキシルアミンとの反応を調べた。いずれのBTGaseも合成基質がベンジルオキシカルボニルアスパラギニルグリシン、ベンジルオキシカルボニルグルタミン、グリシルグルタミニルグリシンの場合反応しない。しかし合成基質がベンジルオキシカルボニルグルタミニルグリシンの場合の反応性は最も高い。この時の各種合成基質濃度は5mMとした。結果は表-1に示される。

なお、表-1中のCBZはベンジルオキシカルボニル基の略であり、Glnはグルタミニル基の略であり、Glyはグリシル基の略であり、Aspはアスパラギニル基の略である。

特開平2-257831 (7)

表-1

基 質	BTG-1	BTG-2	BTG-3
CBZ-Gln-Gly	96	96	96
CBZ-Gln-Gly-oEt	100	100	100
CBZ-Gln-Gln-Gly	63	44	42
CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly	38	39	35
CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly	8	12	11
CBZ-Gly-Gly-Gly-Gly	23	58	60
CBZ-Gln	0	0	0
CBZ-Asp-Gly	0	0	0
Gly-Gln-Gly	0	0	0

f) 金属イオンの影響：

活性測定系に 1 mM 濃度になるように各種金属イオンを加えて影響を調べた（結果は表-2 に示される）。いずれの BTGase も Cu^{2+} , Zn^{2+} により活性が阻害される。

表-2

金属イオン	BTG-1	BTG-2	BTG-3
None	96	96	96
Ca^{2+}	100	100	100
Ba^{2+}	101	102	102
Co^{2+}	101	99	105
Cu^{2+}	103	103	103
Fe^{2+}	79	82	86
K^{+}	96	99	105
Mg^{2+}	102	104	103
Na^{+}	98	97	97
Ni^{2+}	99	102	101
$Pb(CH_3COO)_2$	102	100	101
Sr^{2+}	97	97	100
Zn^{2+}	100	101	100
	15	24	24

g) 阻害剤の影響：

各阻害剤を 1 mM になるように加え、25℃、30分放置後、活性を測定した（結果は表-3 に示される）。いずれの BTGase も バラクロロマーキュリ-安息香酸 (PCMB と略す)、N-エチルマレイミド (NEM と略す)、モノヨード酢酸により活性が阻害される。

表-3

阻害剤	BTG-1	BTG-2	BTG-3
None	100	100	100
EDTA	102	98	99
PCMB	54	61	63
NEM	5	5	3
モノヨード酢酸	64	50	67
PMSP	104	95	101

表-3 中 PMSP は フェニルメチルスルホニルフルオライドの略である。

h) 等電点：

アンボライン等電点電気泳動により求めたところ、BTG-1 の等電点 pI は 9 付近であり、BTG-2 の等電点 pI は 9.7 付近であり、BTG-3 の等電点 pI は 9.8 付近である。

i) 分子量：

SDSディスク電気泳動法により求めたところ、BTG-1 の分子量は約 38,000 であり、BTG-2 の分子量は約 41,000 であり、BTG-3 の分子量は約 41,000 である。

j) MTGase との比較：

次に BTGase とモルモット肝由来のトランスクルタミナーゼ (MTGase) との性質を比較する。尚、MTGase は、特開昭58-149645 号に記載された方法で調製した。

表-4 には各酵素化学的性質の比較を、表-5 には Ca^{2+} の活性に及ぼす影響を示す。表-4 および表-5 より明らかのように従来主として研究されている MTGase との放線菌由来の BTGase とには酵素化学的性質において種々の差が見られ、特に温

特開平2-257831 (8)

度安定性、分子量、等電点、基質特異性に差が見られる。また、 Ca^{2+} の存在下及び非存在下においてもBTGaseは作用する点等でもMTGaseとは明らかに差がみられる。従って、BTGaseの各酵素はMTGaseとはその性質を異にするものと考えられる。

表-4

	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
至適pH	6~7	6~7	6~7	6
pH安定性	5~9	5~9	6~9	6~7.5
至適温度	55°C付近	45°C付近	45°C付近	50~55°C
温度安定性(%)				
40°C保存率	88	86	80	96
50°C保存率	74	56	53	40
分子量	約38,000	約41,000	約41,000	約90,000
等電点	9.0	9.7	9.8	4.5
基質特異性(%)				
CBZ-Gln-Gly	100	100	100	100
CBZ-Gln-Gly-OBt	63	44	42	122
CBZ-Gln-Gln-Gly	38	39	35	288
CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly	8	12	11	126
CBZ-Gly-Gly-Gly-Gly	23	58	60	27

表-5

金属イオン	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
None	%	%	%	%
1mM CaCl_2	99	98	100	0
5mM CaCl_2	100	100	99	39

(4) BTGaseの製造例

a) BTG-1 の製造

ストレプトベルチシリウム・モバラエンス (IFO 13819) を培地組成ポリペプトン 0.2%、グリコース 0.5%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1% からなる培地 (pH 7) 200 mL に接種し、30°C、48時間培養し、得られた種培養液をポリペプトン 2.0%、ラスターーゲン 2.0%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1%、酵母エキス 0.2%、消泡剤としてアデカノール (商品名、旭電化社製品) 0.05% からなる培地 20 L (pH 7) に加え 30°C で 3 日間培養後ろ過し、培養液 18.5 L 得た。このものの活性は、

0.35 U/mL である。

培養液を塩酸で pH 6.5 に調整し、予め 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化しておいた CG-50 (商品名、オルガノ社製品) のカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。さらに同緩衝液で不純蛋白質を洗い流した後、さらに 0.05~0.5 M の同緩衝液の濃度勾配をつくり、通液して溶出液を分画回収し、比活性にの高い分画を集めた。電導度を 1.0 ms 以下になるように希釈後ブルーセファロースのカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。更に 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7) で不純蛋白質を洗い流した後、0~1 M の食塩濃度勾配をつくり通液して溶出液を回収し非活性の高い分画を集めた。UP6000 膜を使い濃縮し、0.5 M の食塩を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7) で緩衝液を用いて平衡化させた。

得られた濃縮液を同緩衝液で予め平衡化しておいたセファデックス G-75 (ファルマシアファインケミカル社製) を含むカラムに通し、同緩衝液

特開平2-257831 (9)

液を流して溶出液を分離した。この結果活性部分は単一のピークとして溶出された。このものの比活性は、培養液に対し 625 倍であり、回収率は 47 % であった。

b) BTG-2 の製造

BTG-1 の場合と同様にして、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム IFO 12776 を 30 ℃ で 3 日間培養後ろ過し、培養液 1.9 ℥ を得た。このものの活性は 0.28 U/mg であった。

BTG-1 の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

c) BTG-3 の製造

BTG-1 の場合と同様にして、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム IFO 12852 を 30 ℃ で 3 日間培養後ろ過し、培養液 1.8.5 ℥ を得た。このものの酵素活性は 0.5 U/mg であった。

BTG-1 の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

以下、本発明を実施例により更に説明する。

100、及び 200 U となるようにそれぞれ添加し室温 (25 ℃) で 30 分間保持して、TGase を作用させた。

このようにして TGase を作用させた各サンプル (各タンパクスラリー) をエジェクター類似混合管にて高温蒸気吹込みにより 120 ℃ で 10 秒間保つ加熱をし、次いで 600 mbar 程度の減圧に保持してあるサイクロン内に噴出し、急速に 60 ℃ に冷却した。

このものを噴霧乾燥 (約 160 ℃) することにより 5 種類の大豆タンパク粉末を得た。

因みに、上記大豆タンパク粉末についてゲル化能の評価を次のようにして、行なった。

(1) ゲル調製法

大豆タンパク粉末 100 g に水 350 cc を加え、攪拌機により 15 分間混練し、この混練物を非可食性ケーシングチューブ (折幅 4.7 mm) に充填した。次いで、90 ℃ の熱水中で 50 分間加熱後、水道水にて常温まで冷却することにより、評価用ゲルを調製した。

実施例 1

脱脂大豆 (米国イリノイ州産大豆を剥皮後室温でヨーハキサンで抽出して得たもの) を 9 重量倍の水に添加した。該混合物の pH は 6.4 であった。これに水酸化ナトリウムを加えて pH 7.0 に調整後 40 ℃ で 30 分間攪拌してタンパクの抽出を行なった。抽出処理物からスーパー・デカンターによりオカラを除去して抽出液を得た。

この抽出液の pH を aq. H₂SO₄ にて 4.5 に調整してタンパクを等電沈澱させ、スーパー・デカンターによりホエイを除去してタンパクカーボド乾物 (固形分 31 %) を得た。

カーボド乾物当り 8 重量倍の水を加えてディスパースミルにより解碎してタンパクスラリーとし、NaOH を用いて pH 5.0、5.5、6.0、6.5 及び 7.0 の 5 種の中和タンパクスラリーを調製した (前からサンプル No. 1 ～ No. 5 と称する)。各サンプルのタンパク含量は 3.2 重量 % 前後であった。

サンプル No. 1 ～ 5 にタンパク 1 g 当り BTGase (BTG-1、比活性 1.9 U/mg) を 0.1、1、10、

(2) ゲル強度の測定

ゲルを厚さ 3.0 mm に輪切りにしたもの用い、不動工業製レオメーターにて、プランジャーは 7 mm の球を用いて得られたゲル強度 (kg) をゲルの表面積 (cm²) で割った値 (kg/cm²) で表示した。

(3) 官能評価

ゲルを厚さ 5 mm に輪切りにしたもの用い、パネル数 10 名 (男 5 名、女 5 名) により、10 点法にて、色調と臭いを評価した。

評価基準: 10 … 非常にすぐれている、8 … かなりすぐれている、5 … 普通 (対照、pH 7、BTGase 不使用)、3 … かなり劣る、0 … 非常に劣る。

上記の結果を表-6 にまとめて示す。

特開平2-257831 (10)

本発明の方法により低pH、例えばpH5.5～6.5で処理すれば、ゲル強度を維持したまま、色調、味、風味も改善された植物性タンパク粉末が得られた、またこのタンパク粉末のゲル形成能は、TGase不使用の場合に較べて、1.5～2.0倍にも達する。

实施例 2

全脂大豆フレーク（米国イリノイ州産大豆を剥皮後圧扁したもの）に9重量倍の水を加え、ミキサーにて攪拌し、大豆スラリーを得た。このものを100℃で2-3分加熱し、その後遠心分離機にてオカラを除去し、豆乳を得た。

次に、この豆乳にタンパク 1 g 当り BTGase (BTG-1 比活性 1100 U/g) を 0.1, 1, 10, 20 および 100 U となる様にそれぞれ添加し、50 ℃にて 30 分間保持して、TGase を作用させた。この様にして TGase を作用させた豆乳をエジェクター類似混合管にて高温蒸気吹き込みにより、120 ℃ 4 秒間保つ加熱をし、次いで 500 mmHg 程度の減圧に保持してあるサイクロン内に噴出し、

ゆが白く濁るので透過率は低くなる。従って数値は高いほど良い。)

③官能評価 豆腐の凝固状態や食感について、官能評価を行った。

上記の結果を表-7にまとめて記す。

急速の50℃に冷却した。このものを凍結真空乾燥し、さらにミキサーにて粉末化し5種類の豆乳粉末を得た。

因みに、上記豆乳粉末について、次の様に豆腐を調整し、評価を行った。

(1) 豆腐の調整方法

豆乳粉末 60 g に水 940 g を加え、ミキサーにて溶解させた。その後、100°Cまで加熱し、80°Cまで冷却した豆乳に 0.4 重量% となる様、少量の水で溶いた硫酸カルシウムを加えて 10 分間静置した。このものを木綿さらし布を敷いた豆腐型箱に流し込み、重石をのせて 20 分間水切りをして、ゆを除き豆腐を得た。

(2) 豆腐の評価方法

(1)の方法で調整した豆腐について、以下の評価を行った。

①豆腐の保水力・・・水切りの際、出てくるゆの量を測定し、少ないほど保水力が高いと判断した。

②豆腐の凝固性・・・水切りの際出てくるゆの逃過率を測定した。（タンパクが凝固していないと、

特開平2-257831 (11)

豆乳粉末を作る過程において、BTGaseを作用させることにより、市販豆腐粉に比べ、豆腐の凝固性を大幅に改善でき、また保水力も上昇した豆腐を作ることのできる豆乳粉末を得ることができた。またBTGase不使用の場合に比べ、凝固状態が改善された。

実施例3

全脂大豆フレーク（米国イリノイ州産大豆を剥皮後圧搾したもの）に9重量倍の水を加え、ミキサーにて攪拌し、大豆スラリーを得た。このものを100℃で2-3分加熱し、その後遠心分離機にてオカラを除去し豆乳を得た。

次にこの豆乳にタンパク1g当りBTGase(BTG-1比活性1100U/g)を1, 10および50Uとなる様、添加し、同時にL-アスコルビン酸ナトリウムを0.1重量%添加して、50℃にて30分間保持し、TGaseを作用させた。

この様にしてTGaseを作用させた豆乳を100℃で3-5分加熱し、冷却した。このものを噴霧乾燥（約160℃）することにより3種類の豆乳

表-7

処理条件 BTGase (U)	豆腐の保水力 中の量 (g)	豆腐の凝固率 中の通過率 (%)	官能評価
0	260	97.1	やや粉っぽくモロモロの凝固物
0.1	255	97.8	凝固状態が改善されながらかがでてくる
1	250	97.8	
10	240	98.1	非常にながらかで市販の豆腐とほぼ同様の食感
20	230	98.1	
100	255	98.5	なめらかさがある
市販豆腐粉	270	85.9	粉っぽく臭いが悪い

粉末を得た。

これらの豆乳粉末について、実施例2と同様に、豆腐を調整し、評価を行った。

上記の結果を表-8にまとめて記す。

表-8

処理条件 BTGase (U)	豆腐の保水力 中の量 (g)	豆腐の凝固率 中の通過率 (%)	官能評価
0	80	97.8	色調が改善される
1	75	97.9	
10	60	98.0	色調の改善と共に非常になめらかな豆腐となる
50	50	98.0	
0	260	97.1	やや粉っぽくモロモロの凝固物

豆乳粉末を作る過程において、BTGaseを作用させると同時に、還元剤を添加することにより、非常に保水力の高い豆腐を作ることのできる豆乳粉末を得ることができた。

实施例 4

実施例2で得られた豆乳粉末および実施例3で得られた豆乳粉末の内、BTGase処理1.0 U/g・タンパクのものをそれぞれ6.0 gとり、水94.0 gを加えてミキサーにて溶解した。その後、これらを80℃まで加温して0.4重量%となる様、少量の水で溶いた硫酸カルシウムを加えて10分間静置した。

このものを木綿さらし布を敷いた豆腐型箱に流し込み、重石をのせて20分水切りをして、ゆを除き豆腐を得た。

上記方法で調整した豆腐と、実施例2、3の方法で調整した豆腐について実施例2の評価方法に基いて評価比較した。

上記の結果を表-9にまとめて記す。

特開平2-257831 (12)

処理条件 加熱条件	豆類の保水力 中の量 (g)	豆類の糊固率 中の透過率 (%)	官能評価
実験例2 100℃	240	98.1	非常にならかで市販の豆類と ほぼ同様の食感
	190	98.1	
実験例3 100℃	60	98.0	糊固せず保形性がない
	50	97.1	
市販豆腐粉 80℃	270	63.2	

本発明の豆乳粉末を用いて豆腐を調製する場合、その凝固温度（通常70-80℃）まで加熱し、調製したものは、従来より行われている方法である100℃まで加熱してから70-80℃まで冷却する方法で調製したものと、品質的に全く差がなく、むしろ少し保水力は高くなり、非常にためらかな豆腐を得ることができた。

(発明の効果)

本発明の様に、植物性タンパク含有水溶液に適當な条件で TGase を作用させることにより得た、植物性タンパク粉末は、そのゲル化能が改善され、また色調・味・風味も改善されたものであった。

この植物性タンパク粉末はもちろん、その用途は前述の様な魚肉・畜肉製品への使用に限られるものではない。その使用に特に支障がなく、その機能を活用出来る限りは、一般食品工業に優れた用途を有する。

さらに、この植物性タンパクが大豆タンパクである場合、本発明の豆乳粉末から得た豆乳で、通常の方法と全く同じに、また凝固温度(70-80°C)

まで加熱するだけで、容易に保水力の高いなめらかな豆腐を得ることができる。

特許出願人 味の素株式会社

特開平2-257831 (13)

第1頁の続き

⑦発明者 土屋 俊浩 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

جامعة الملك عبد الله